第44卷 第1期
2001年2月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol.44, No.1
Feb., 2001

杆状病毒的垂直传播及绿色荧光蛋白在棉铃虫幼虫中的表达

刘祖强，杨复华，齐义鹏*，朱 应，朱反修
（武汉大学病毒研究所，武汉 430072）

摘要：用转座/穿梭系统构建了携带绿色荧光蛋白基因（*gfp*）的重组棉铃虫核型多角体病毒 rHa-FGP，以其多角体添食感染棉铃虫3龄幼虫，室内饲养3代，各代均可见自然光下发绿色荧光的棉铃虫幼虫，其中子代不再重复感染。F_0、F_1、F_2 代发绿色荧光的棉铃虫幼虫所占百分比分别为34%、20%、8%。提取虫体内的病毒多角体DNA，以PCR和斑点杂交鉴定表明，*gfp* 不仅在亲代棉铃虫体内正常表达，而且在子代幼虫中表达，HaNPV通过卵实现了垂直传播。

关键词：绿色荧光蛋白基因；重组棉铃虫核型多角体病毒；垂直传播
中图分类号：Q963　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）01-0001-08

自1983年以来，杆状病毒作为表达载体显示了极大的优越性，到目前为止已经在昆虫细胞中表达了数百种外源基因。1994年Chalfie等[1]首次在大肠杆菌中表达了水母 *Aequorea victoria* 的绿色荧光蛋白基因（green fluorescent protein gene，*gfp*）。此后 *gfp* 作为一种新型的报道基因得到广泛应用[2,3]。1997年朱反修等[4]用 *gfp* 作为杆状病毒表达系统的报道基因获得成功。1998年朱应等[5]用携带 *gfp* 的杆状病毒感染昆虫，首次获得发射绿色荧光的幼虫。然而，幼虫被感染致死，得不到子代绿色幼虫。

杆状病毒的传播分为直接传播和间接传播。前者指无需媒介介导的感染；后者指媒介介导的感染。直接传播又可分为水平传播和垂直传播。水平传播是指不经过昆虫生殖系统的个体之间的传播。垂直传播是从昆虫亲代到子代的传播[6]。

关于杆状病毒的垂直传播现象，国外学者已在莎草粘虫 *Spodoptera exempta*[7]、草地夜蛾 *S. frugiperda*[8]、海灰翅夜蛾 *S. littoralis*[9]、甜菜夜蛾 *S. exigua*[10]等中发现。1995年Mori等[11]利用杆状病毒介导荧光素酶基因在家蚕中表达证明了杆状病毒的垂直传播。到目前为止，国内尚未见有关杆状病毒垂直传播的报道。本文利用绿色荧光蛋白基因为标记基因构建重组杆状病毒并感染昆虫，从基因水平证明宿主昆虫在低剂量重组病毒感染之后不仅能稳定携带，而且能通过生殖系统垂直传播到子代昆虫，获得了具有绿色荧光表型的昆虫幼虫，实现了绿色荧光蛋白在昆虫体内的传代表达，这种昆虫为研究病毒的流行学，昆虫生理学和昆虫迁飞提供了一条新途径。

基金项目：国家攀登计划（85-31-01-04）和“九五”攻关项目（95-001-02-04）
* 联系与负责作者
收稿日期：1999-07-19；接受日期：2000-01-31

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞和病毒

转座载体 pFastBac1 来源于 GIBCO/BRL 公司；穿梭载体 Hanpvid 和质粒 pBlueph 由本实验室构建[5,12]；pS65T 由美国加州大学 Tsien 博士赠送。野生型棉铃虫核型多角体病毒（*Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus，HaNPV）由中国科学院武汉病毒所张光裕研究员提供；棉铃虫细胞系 HZ-AM1 由武汉大学杜全胜博士赠送。大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存；dNTP 购自 Biotech 公司，Taq DNA 聚合酶购自 Biostar International 公司；生物素标记和检测试剂盒购自华美生物工程公司；Grace's 培养基、胎牛血清、Lipofetin 等购自 GIBCO/BRL 公司。其余生化和化学试剂均为国产。实验用棉铃虫和饲料由湖北省农业科学院提供。

1.2 重组转座载体的构建

质粒 pBlueph 含有经亚克隆的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus，AcNPV）多角体基因（*ph*），以 *Pst* Ⅰ + *Xho* Ⅰ 双酶消化并回收 1.3 kb 多角体基因片段。质粒 pS65T 含有突变型的 *gfp* 基因（*gfpS65T*）。以 *Eco*R Ⅰ + *Pst* Ⅰ 双酶消化并回收 0.7 kb *gfpS65T* 基因片段。转座质粒 pFastBac1 DNA 上有庆大霉素抗性基因（Gm），多角体基因启动子（Pph），多克隆位点（MCS），3′，5′两侧是转座子 Tn7 左右臂，以 *Eco*R Ⅰ + *Xho* Ⅰ 双酶消化 pFastBac1，并与上述两个回收片段共连接后转化大肠杆菌 DH5α，在含 Ap/Gm 两种抗菌素的平板上筛选阳性菌落，得到带有 *ph* 及 *gfpS65T* 两个基因的重组质粒 pFGP。

1.3 重组穿梭载体的构建

以穿梭载体 Hanpvid 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α，在含 Kan/IPTG/X-gal 平板上筛选蓝色阳性菌落，得到含 Hanpvid 的大肠杆菌。以质粒 pHelper（Tet 抗性）转化含 Hanpvid 的大肠杆菌，在含 Kan/Tet 平板上筛选阳性菌落，命名为大肠杆菌 DH5Ha。将含有 *gfpS65T* 和 AcNPV 多角体基因（*ph*）的重组转座质粒 pFGP 转化大肠杆菌 DH5Ha，37℃ 培养 4 h 后，在含 IPTG/X-gal 及 Kan/Tet/Gm 三种抗菌素的平板上筛选白色阳性重组菌落，得到重组穿梭载体 pHa-FGP。

1.4 细胞培养与病毒感染

将棉铃虫细胞 HZ-AM1 用Grace's 培养基（补加 0.035% $NaHCO_3$，0.33%水解乳蛋白，0.33%酵母提取物，8%胎牛血清，pH 6.2）置 27℃ 培养，以细胞浓度 4×10^5/mL 进行传代，约 48 h 细胞即处于对数生长期，用 Lipofectin 法将 pHa-FGP DNA 转染细胞，置 27℃ 培养 6 天，收获重组棉铃虫核型多角体病毒，命名为 rHa-FGP。

1.5 病毒对幼虫的感染及其传代饲养

选取健康 3 龄棉铃虫幼虫，饥饿过夜，按剂量 2×10^4 PIB/头，2×10^5 PIB/头，2×10^6 PIB/头分三组（每组 50 头）用重组病毒 rHa-FGP 添食感染。待含病毒饲料吃完后，补加无病毒的饲料。统计 F_0 代各组发绿色荧光幼虫比例及化蛹比例。确定最佳感染剂量组。待该组幼虫化蛹，羽化和产卵后，采用 4% 甲醛浸泡 15 min 进行卵表消毒，继续饲养至 F_2 代，其间不再用重组病毒 rHa-FGP 感染。观察和检测棉铃虫 F_1、F_2 代幼虫的带毒和 GFP 表达。

1.6 病毒 DNA 的制备

参照齐义鹏[13]所述方法，有改进。将病毒致死虫匀浆，差速离心获得多角体。取一定量多角体，加入适量 0.01 mol/L Na_2CO_3 - 0.05 mol/L NaCl，再缓慢加入 0.1 mol/L Na_2CO_3 - 0.05 mol/L NaCl，调 pH 至 9～10，加入 10% SDS 至终浓度 1%，37℃放置 45 min，离心，使多角体溶解，病毒粒子释放，用常规方法提取病毒粒子 DNA，-20℃保存备用。

1.7 聚合酶链式反应（PCR）

根据引物设计原则，参照 *gfp* 基因的 cDNA 全序列，设计用于扩增 *gfp* 基因的引物，其序列如下：

正向引物：5′-TCA CTG GAG TTG TCC CA-3′

反向引物：5′-TGT ATA GTT CAT CCA TG-3′

引物由 Genemed Synthesis 公司合成。

在 0.5 mL 离心管中顺次加入 10 mmol/L dNTP 4 μL，引物 1 和引物 2 各 5 μL，模板 DNA 5 μL，10×Buffer 5 μL，无菌双蒸水 25 μL，于 94℃变性 9 min 后加入 1 μL Taq DNA 聚合酶（2U），混匀后覆盖 40 μL 无菌液体石蜡，以 94℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 2 min 为一个循环，共进行 35 个循环。循环结束，72℃延伸 9 min，反应产物放入 4℃冰箱冷却。

1.8 斑点杂交（dot blot）

参照华美生物工程公司提供的说明书，以质粒 pS65T DNA 为标记 DNA，用 Nick translation 法制备生物素标记的 *gfp* 探针。提取重组病毒 DNA，点在尼龙膜上，用探针进行杂交。杂交参照 Sambrook 等[14]的方法，有改进。

2 结果

2.1 重组病毒 rHa-FGP 的构建

将 AcNPV 的完整多角体基因（*ph*）和绿色荧光蛋白基因（*gfp*）插入转座载体 pFastBac1 的 MCS 中，构建成重组转座载体 pFGP，以 *ph* 基因启动子（Pph）控制 *gfp* 基因表达，而插入的另一拷贝 *ph* 基因带有自身的启动子，在受体菌大肠杆菌 DH5Ha 中，pFGP 的转座子 Tn7 左右侧翼序列在助手质粒（pHelper）提供的反式因子作用下，将 *gfp* 和 *ph* 基因转座到 HaNPV 的穿梭载体 Hanpvid 的 Tn7 接受位点（Tn7 att），构建成 HaNPV 的重组穿梭载体 pHa-FGP。pHa-FGP 上的 miniF ori 使其在大肠杆菌中低拷贝扩增，同时上面还含有 HaNPV 全基因组，使其对棉铃虫细胞具有感染性，因而能在 HZ-AM1 细胞和棉铃虫幼虫中正常复制表达，装配成 HaNPV 的多角体颗粒，即重组病毒 rHa-FGP。全部构建过程见图 1，酶切和杂交证明构建过程是成功的（图片略）。

2.2 *gfp* 基因在棉铃虫细胞系和幼虫中的表达

以重组病毒 rHa-FGP 感染棉铃虫细胞 HZ-AM1，48 h 后出现病毒感染的特征性 CPE（cytopathic effect：致细胞病变作用），即细胞变圆，细胞核膨大。在荧光显微镜下可见被感染的细胞发绿色荧光（图版Ⅰ：1）。以此病毒添食感染棉铃虫 3 龄幼虫，6 天后在自然光下即可见被感染的棉铃虫发绿色荧光（图版Ⅰ：2-1）。以上结果表明 *gfp* 基因在棉铃虫细胞系和幼虫中得到表达。

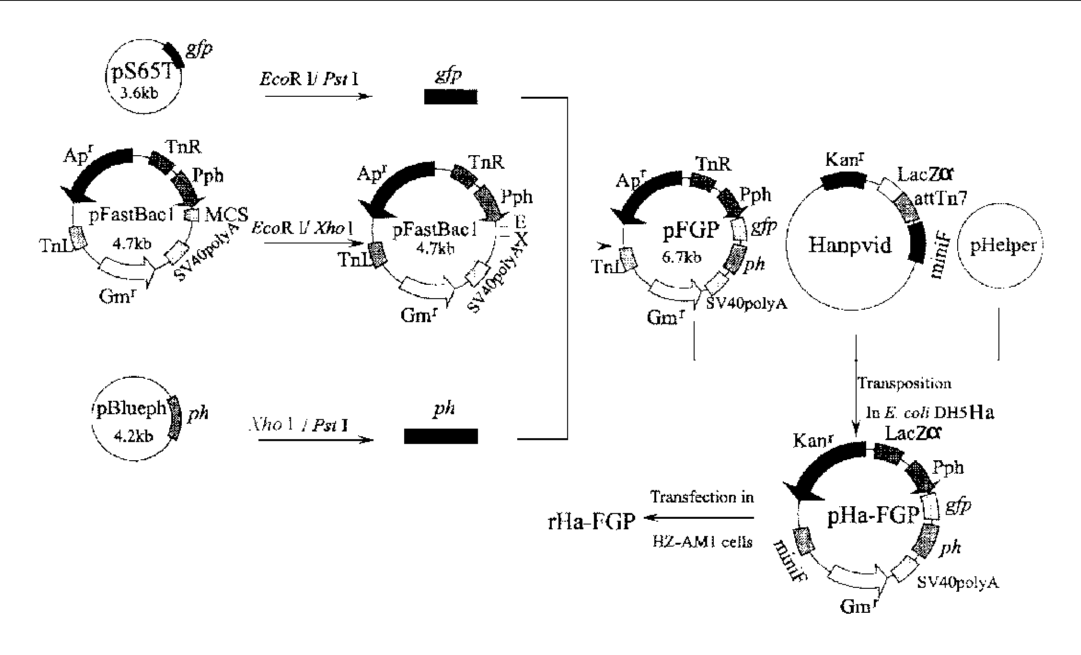


图1 重组棉铃虫核型多角体病毒 rHa-FGP 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant *H. armigera* nuclear polyhedrosis virus

2.3 病毒介导的 *gfp* 基因在棉铃虫幼虫中的垂直传播

以重组病毒 rHa-FGP 2×10^4 PIB/头、2×10^5 PIB/头、2×10^6 PIB/头添食感染棉铃虫3龄幼虫，统计 F_0 代各组发绿色荧光幼虫及化蛹比例（表1）。从表1看出，用高剂量病毒感染，虽然能得到较高比例的发绿色荧光幼虫，但被感染幼虫均已死亡，不能化蛹产卵。而低剂量感染幼虫死亡率低，发绿色荧光幼虫的比例也很低。经过多次实验发现，以 2×10^5 PIB/头为最适感染剂量，所获发绿色荧光幼虫比例高，化蛹率也高，便于进行传代研究。从感染剂量为 2×10^5 PIB/头的实验组中，选取绿色棉铃虫幼虫所化的蛹继续孵育，待其羽化后配对，3天后收集配对成虫所产卵孵化。随机选取50头幼虫，不再重复感染，饲养至 F_1、F_2

表1 不同剂量的重组病毒对棉铃虫3龄幼虫的感染

Table 1 Infection of third instar larvae with different dosages of rHa-FGP

感染剂量① (PIB/头)	总虫数② (头)	绿虫数③ (头)	绿虫所占比例④ (%)	绿虫化蛹数⑤ (头)	绿虫化蛹率⑥ (%)
2×10^6	50	26	52	2	7.7
2×10^5	50	17	34	10	58.8
2×10^4	50	8	16	3	37.5
0	50	0	0	0	0

绿虫指发射绿色荧光的棉铃虫幼虫 Green larvae were the larvae that emitted green fluorescence; ①dosage of infection; ②number of larvae tested; ③number of larvae emitting green fluorescence; ④percentage of larvae emitting green fluorecence; ⑤number of pupae from larvae emitting green fluorescence; ⑥percentage of pupation in larvae emitting green fluorescence; 表2同此 The same for Table 2

代，统计各代发绿色荧光幼虫及化蛹比例（表 2）。分别收集各代发绿色荧光的棉铃虫幼虫（图版Ⅰ：3）。

从表 2 可看出 F_0 代感染后不再重复感染的棉铃虫饲养至 F_1、F_2 代，发射绿色荧光的棉铃虫幼虫所占比例在 F_0、F_1、F_2 代逐次递减，但每代发射绿色荧光的棉铃虫幼虫均有部分化蛹，表明低剂量病毒感染后，重组病毒能通过棉铃虫的传代实现垂直传播并表达 GFP 蛋白。

表 2　同一剂量的重组病毒感染棉铃虫 3 龄幼虫及传代饲养

Table 2　Culture of third instar larvae infected once with rHa-FGP for three generations

世代 Generation	感染剂量（PIB/头）	总虫数（头）	绿虫数（头）	绿虫所占比例（%）	绿虫化蛹数（头）	绿虫化蛹率（%）
F_0	2×10^5	50	17	34	10	59
	0	50	0	0		0
F_1	2×10^5	50	10	20	7	70
	0	50	0		0	0
F_2	2×10^5	50	4	8	2	50
	0	50	0	0	0	0

2.4　病毒介导的 *gfp* 基因在昆虫传代中表达的分子生物学鉴定

2.4.1　PCR 鉴定：分别以来自 F_0、F_1、F_2 代棉铃虫幼虫体内的 rHa-FGP DNA、野生型 HaNPV DNA 和 pS65T DNA 为模板，以所设计的引物进行 *gfp* 基因的 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，可见阳性对照 pS65T 和 F_0、F_1、F_2 代棉铃虫体内 rHa-FGP 均有 0.7 kb 的 *gfp* 靶片段扩增产物，而阴性对照无此扩增片段（图 2）。

2.4.2　Dot blot 鉴定：分别以来自棉铃虫 F_0、F_1、F_2 代幼虫体内的 rHa-FGP DNA 和野生型 HaNPV DNA 与 *gfp* 探针杂交，结果表明 F_0、F_1、F_2 代棉铃虫体内 rHa-FGP 和阳性对照 pS65T 均有较强的杂交信号，而阴性对照无杂交信号（图 2）。

图 2　各代棉铃虫幼虫体内重组病毒 rHa-FGP 的 PCR 扩增（a）和 dot blot 杂交（b）

Fig. 2　Identification of rHa-FGP in larvae of three successive generations

1，2，3 分别为来自 F_0，F_1，F_2 代棉铃虫幼虫体内的 rHa-FGP；4 为质粒 pS65T；5 为野生型 HaNPV

1. rHa-FGP DNA in larvae of F_0; 2. rHa-FGP DNA in larvae of F_1; 3. rHa-FGP DNA in larvae of F_2; 4. pS65T DNA; 5. wild type HaNPV DNA; M. PCR DNA marker

以上结果均说明 rHa-FGP 被棉铃虫携带传代，通过生殖系统实现了垂直传播，*gfp* 基因在昆虫传代中得到表达。

3 讨论

Hanpvid 是携带 HaNPV 的全基因组与转座-穿梭盒的穿梭载体[5]，它既能在大肠杆菌中以质粒的形式复制，又能在棉铃虫细胞中形成感染性病毒粒子，但由于转座-穿梭盒插在多角体基因（*ph*）位相，导致 Hanpvid 感染棉铃虫细胞后不形成多角体。而在自然条件下，多角体的存在对于病毒的口服感染和流行传播是至关重要的[15]，所以我们在转座载体 FastBacl 的 MCS 中插入两个外源基因：*gfp* 和 *ph*，使多角体基因已插入失活的重组病毒 rHa-FGP 得到了另一拷贝的多角体基因，从而能够产生多角体，有利于对棉铃虫幼虫的口服感染。

室内感染棉铃虫发现，F_0 代感染后不再重复感染的棉铃虫饲养至 F_1、F_2 代，发绿色荧光的棉铃虫幼虫比例有所下降，同时 F_1、F_2 代棉铃虫荧光出现的时间较 F_0 代有所推迟，这与 Mori 等[11]发现荧光素酶基因在家蚕传代中表达时酶活力下降类似，推测这可能与病毒的数量及其累积所需时间有关，还可能与昆虫的免疫系统对病毒的包埋和清除有关[15]。

本研究利用 *gfp* 作标记基因，首次证明了重组病毒 rHa-FGP 在棉铃虫体内的垂直传播，丰富了杆状病毒垂直传播的证据。与 Mori 等[11]的工作相比，本研究由于 *gfp* 基因表达及 GFP 蛋白检测不需任何辅助因子参加，证据更为直观，操作更为简便。

棉铃虫是一种多食性害虫，我国每年都以高昂的代价来防治棉铃虫。棉铃虫具有很强的迁飞能力[16]。为了有效防治棉铃虫，必须掌握其迁飞规律。对迁飞棉铃虫的识别及迁飞路线的确定，在昆虫学领域一直采用同位素标记，染料涂抹，或成虫携带的花粉种类进行研究。由于同位素的污染，染料的褪色以及花粉种类的非地区特异性或难以携带，不仅给棉铃虫迁飞研究带来极大的困难，更造成了研究结果的重复性差等弊端。本研究表明，用带 *gfp* 基因的杆状病毒标记昆虫幼虫，其后代幼虫亦成为在自然光下发绿色荧光昆虫。因此，如果用此法标记昆虫，在一个地区放飞这种携带 *gfp* 标记基因的成虫，只要在另一地区发现有发绿色荧光幼虫，它就是从放飞地迁飞而来。这将给昆虫的迁飞研究带来重大变革。

参 考 文 献（References）

[1] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G *et al*. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 1994, 263: 802～805

[2] 岳莉莉，齐义鹏，杜全胜等. 用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统高效表达绿色荧光蛋白标记的 HBVe 抗原. 病毒学报，1998，14（3）：234～239

[3] Subramanian K, Meyer T. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. Cell, 1997, 89: 963～971

[4] 朱反修，齐义鹏，黄永秀等. 绿色荧光蛋白基因在昆虫细胞中的克隆与表达. 微生物学报，1997，37（1）：15～20

[5] 朱 应，齐义鹏，刘德立. 转座子介导的新型杆状病毒表达系统及绿色荧光昆虫的研究. 科学通报，1998，43：2 178～2 183

[6] Fine P E M. Vector and vertical transmission: an epidemic logic perspective. Proc. N. Y. Acad. Sci., 1975, 266: 173～194

[7] Swaine G. Generation-to-genetion passage of the nuclear polyhedra virus of *Spodoptera exempta*（WLK）. Nature，1966，210：1 053～1 054

[8] Kuno G. A nuclear-polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* isolated in Puerto Rico. J. Agric. Unic. P. R，1979，63：162～169

[9] Abul-Nasr S E，Ammar E D，Abul-Ela S M. Effects of nuclear polyhedrosis virus on various development stages of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*（Boisd）. Z. Angew. Entomol.，1979，88：181～187

[10] Smits P H，Vlak J M. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol.，1988，51：107～114

[11] Mori H，Yamao M，Nakazawa H *et al*. Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm，*Bombyx mori*，by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Biotechnology，1995，13：1 005～1 007

[12] 王福山，黄永秀，齐义鹏等. 多角体完整重组病毒的构建及苏云金杆菌截短内毒素基因的表达. 科学通报，1995，40：1 896～1 900

[13] 齐义鹏. 基因及其操作原理. 武汉：武汉大学出版社，1998

[14] Sambrook J，Fritsch E F，Maniatis T. Molecular Clones：a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989

[15] Washburn J O，Kirkpatrick B A，Volkman L E. Insect protection against viruses. Nature，1996，383：767

[16] Chittihunsa T，Sikorowski P P. Transmission of *Microplitis croceipes*（Hymenoptera：Braconidae）nonoccluded baculovirus（Baculoviridae：subgroup C）. Environ. Entomol.，1996，25：192～197

Vertical transmission of baculovirus and expression of baculovirus-mediated green fluorescent protein gene in successive generations of *Helicoverpa armigera*

LIU Zu-qiang，YANG Fu-hua，QI Yi-peng*，ZHU Ying，ZHU Fan-xiu

（Institute of Virology，Wuhan University，Wuhan　430072，China）

Abstract：A recombinant *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus rHa-FGP carrying green fluorescent protein gene（*gfp*）was constructed by transposon/shuttle system. Third instar larvae of cotton bollworm were fed with the rHa-FGP and reared in laboratory for three successive generations without repeated infection. The percentages of larvae that emitted green fluorescence in the three generations were about 34%，20%，8%，respectively. Recombination baculovirus DNA was extracted from the larvae of each generation，which emitted green fluorescence，and analyzed by PCR and dot blot. The results indicated that the green fluorescent protein gene was expressed in every generation and baculovirus was transmissed vertically from parent to progeny.

Key words：green fluorescent protein gene；recombinant baculovirus；vertical transmission

* Corresponding author

图版说明（Explanation of Plate）

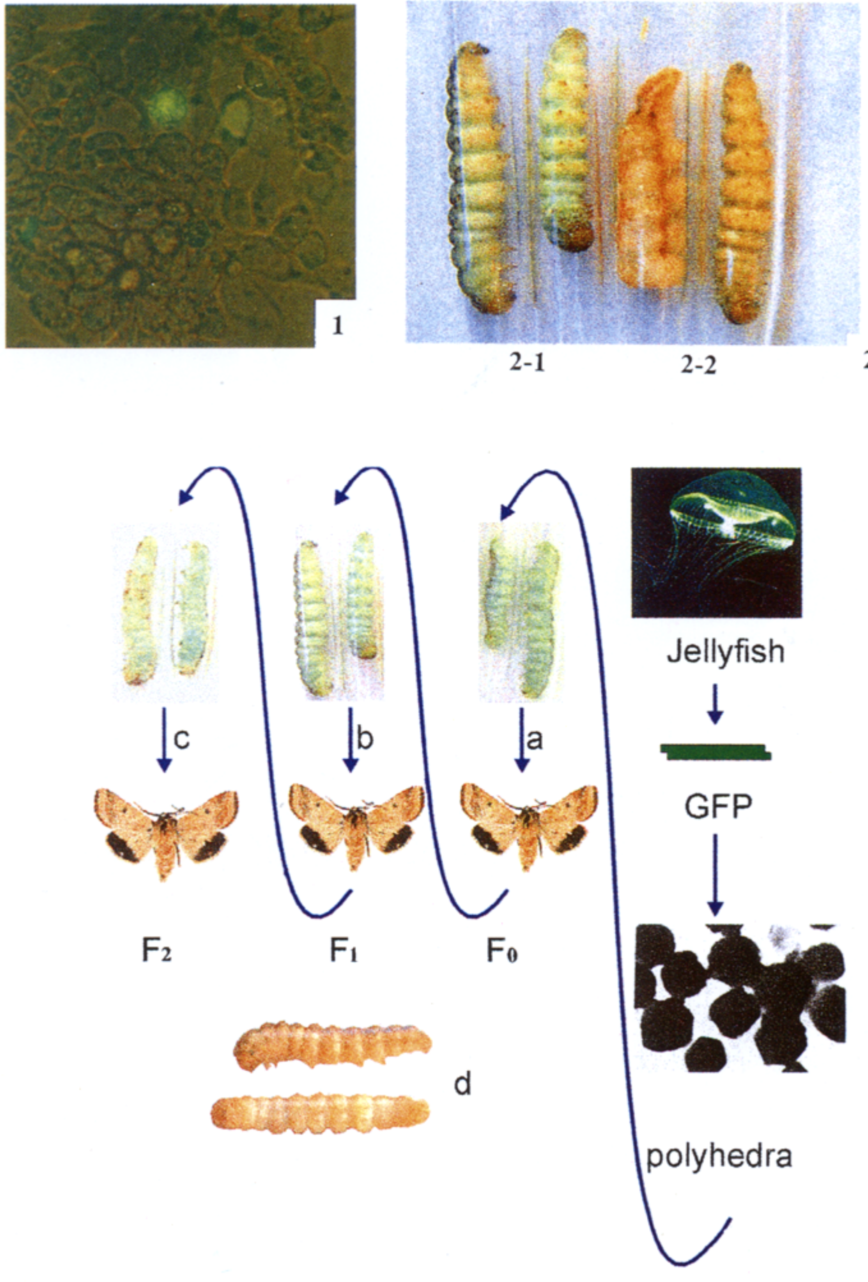
图版Ⅰ（Plate Ⅰ）

1. 重组病毒 rHa-FGP 感染棉铃虫细胞系
   infection of recombinant virus in HZ-AM1

2-1. 重组病毒 rHa-FGP 感染的棉铃虫幼虫
   infected larvae

2-2. 正常棉铃虫幼虫
   uninfected larvae

3. 重组病毒 rHa-FGP 感染的棉铃虫幼虫（a）及其 F_1 代（b）和 F_2 代幼虫（c），d 为未感染的棉铃虫幼虫
   larvae infected with recombinant virus rHa-FGP and its F_1 and F_2 generations: a. larvae of F_0; b. larvae of F_1; c. larvae of F_2; d. uninfected larvae



图版说明见文后（Explanation at the end of the text）